

Amycolatopsis sp.K104-1株由来ポリ乳酸分解酵素 遺伝子および発現機構に関する研究

著者	松田 英美子
号	818
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/16308

氏 名(本籍)	まつ 松	だ 田	え 英	み 美	こ 子
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)				
学 位 記 番 号	農 博 第 8 1 8 号				
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日				
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当				
研 究 科 専 攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)				
学 位 論 文 題 目	<i>Amycolatopsis</i> sp.K104-1 株由来ポリ乳酸分解酵素遺伝子 および発現機構に関する研究				
論文審査委員	(主 査)	教 授	神 尾 好 是		
	(副 査)	教 授	勝 亦 瞭 一		
		助教授	阿 部 敬 悦		

論文内容要旨

序論

ポリ乳酸エステル (PLA, Fig. 1) は、トウモロコシ澱粉などの再生可能な植物資源から生産される自然循環型プラスチックであり (Fig. 2)、既存の化学工業的手法により大量生産が可能である。ポリ乳酸はこれまで開発の進んでいた他の生分解プラスチックと比較して、ガラス転移点が高い、引張強度が高いといった点で成形性に優れており、また従来の石油化学合成樹脂と比較しても引けを取らない物性を有している (Table 1)。そのため、PLA は自然循環型生分解プラスチックの中でも近年特に注目されており、トヨタによる自動車部品への利用、ソニーのMD 製品の包装資材、ゴミ袋、台所での水切り袋、食品包装容器資材などの様々な用途に対する製品開発および生産販売が進んでいる。2002 年より米国カーギル・ダウポリマー社では年間 14 万トン生産する大規模なポリ乳酸プラントが稼働しており、今後ポリ乳酸の価格の低下による普及が期待されている。ところがこの様なポリ乳酸製品の普及の一方で、自然界におけるポリ乳酸の分解は緩慢であり、土壌中に埋設した場合には年単位の時間を必要とすることが問題となっている。

一般に生分解プラスチックは、環境中の水と微生物の分泌する酵素により、微生物が代謝可能な単位まで高分子結合が切断され (第一段階)、微生物に取り込まれて炭酸ガスと水に分解される (第二段階)。すなわち生分解プラスチックの分解速度は第一段階の微生物の分泌酵素による分解が律速になると考えられる。ポリヒドロキシブチレート並びにポリカプロラクトンなどの生分解プラスチックについては、分解菌、分解酵素、酵素遺伝子について多くの研究がなされてきたが、ポリ乳酸の微生物分解に関する研究は少なく、コンポストにおけるポリ乳酸分解、もしくは既存の酵素である Proteinase K や糸状菌リパーゼによる酵素分解が知られているにすぎなかった。またこれまでの知見から、ポリ乳酸の分解菌は他の生分解プラスチックに対する分解菌と比較して、その存在率が低いことが示されていた。

以上のような背景から本研究室では、今後拡大が予想されるポリ乳酸大量使用による環境負荷を未然に防止するために、1997 年よりポリ乳酸分解菌およびポリ乳酸分解酵素の研究を行ってきた。本研究室の中井は宮城県内 300 箇所からのスクリーニングにより、*Amycolatopsis* sp. と同定したポリ乳酸分解菌 K104-1 株を取得した (Fig. 3)。さらに *Amycolatopsis* sp. K104-1 株の乳化ポリ乳酸液体培地培養上清より、ポリ乳酸分解酵素の精製に世界で初めて成功し (Fig. 4)、その諸性質を明らかにした (Table 2)*。本博士学位論文では、K104-1 株から精製されたポリ乳酸分解酵素の解析と応用研究をさらに進めるために、1) ポリ乳酸分解酵素の遺伝子クローニングおよびその解析、2) *Streptomyces lividans* 1326 株を宿主とした発現系の構築およびリコンビナントタンパク質の精製、さらにシグナルペプチドのプロセッシング機構を解明した。また、本酵素はポリ乳酸分解酵素である一方、カゼイン分解活性を有していることが明らかとなっている (Table 3)。本酵素による様々な基質に対

する作用を調べるために3.1) プロテアーゼとしての性質を検討し、3.2) 分子量22万のポリ乳酸、ポリ乳酸フィルムなどを基質としたときの分解作用について検討した。

*Nakamura K et. al, *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 345-353. (2001).

第1章 ポリ乳酸分解酵素遺伝子のクローニング

本酵素の内部アミノ酸配列を決定するため、*Amycolatopsis* sp. K104-1 株の乳化ポリ乳酸を炭素源とした液体培養上清中よりポリ乳酸分解酵素を精製し、その酵素精製製品を *lysylendopeptidase* で限定分解を行った (Fig. 5)。得られたペプチド断片のアミノ酸配列からプライマーを設計し、PCR により内部遺伝子配列を増幅し、プローブとして使用した。サザンハイブリダイゼーションおよびコロニーハイブリダイゼーションの結果、約 10,000 個のコロニーから 7 個の陽性コロニーを取得した。塩基配列を決定した 4,446bp の中に 238 アミノ酸残基、推定分子量 24,225 のタンパク質をコードする 714bp からなる *orf* を見出した (Fig. 6)。また *orf* の GC% は 69.47% で、放線菌特有である高い GC% を示していた。解析の結果、本 *orf* がポリ乳酸分解酵素遺伝子をコードしており、精製酵素の N 末端および内部配列を含み (Fig. 6, 下線部)、精製した酵素では推定開始メチオニンから 35 アミノ酸残基が欠失している事が明らかとなった。更に、塩基配列から予測した精製酵素の推定分子量 (20,904) と、SDS-PAGE の結果から推定した分子量 (24,000) が一致していなかったため、MALDI-TOF-MS で精製酵素の分子量を測定した。その結果、精製酵素の分子量は 20,904 であることが判明し (Fig. 7)、また塩基配列および推定したアミノ酸配列の正確性も確認された。アミノ酸レベルの相同性検索の結果から、本酵素は真核生物のトリプリンファミリーの属するセリンプロテアーゼを約 30% の相同性を有し、またセリンプロテアーゼ活性中心残基である His, Asp, Ser が本酵素にも保存されていることを見出した (Fig. 8)。

第2章 *pld* 遺伝子発現系の構築と組換え PLD の精製および成熟型 PLD の生成機構の解明

Amycolatopsis sp. K104-1 株によるポリ乳酸分解酵素の生産は 100 μ g/5 L と少なく、不十分であった。本酵素の更なる解析を行い、工業的に利用するためには高発現系の構築が必須である。ところが大腸菌で発現させた場合、IPTG による誘導とともに溶菌し、タンパク質の精製が困難であった。そこで *Streptomyces lividans* 1326 株を宿主として用いることで高発現系の構築を試みた。ベクターは *Streptomyces* と大腸菌とのシャトルベクター pUC702 を用い、YEME 培地でチオストレプトンを選択マーカーとして用いた。CM-5PW、Phenyl-5PW カラムクロマトグラフィーによる精製過程を経て、2 リットルの培養液から約 650 μ g の組換え PLD (rPLD) を得ることに成功した。これは *Amycolatopsis* sp. K104-1 株の培養上清からの精製量よりも約 16 倍に相当する収

量であった。比活性は *Amycolatopsis* sp. K104-1 から精製した PLD とほぼ一致し、*Streptomyces* で発現させた rPLD も正しい高次構造を維持していると考えられた。

この rPLD の発現および精製過程において、適切な培養日数を調べる目的で培養上清を経時的にサンプリングし、SDS-PAGE に供した。その結果、培養 3 日目、5 日目において、精製 rPLD よりも若干大きい分子量を持つタンパク質が見出された。そのタンパク質は PLD 抗体に対して反応し、且つそのタンパク質のアミノ酸 N 末端アミノ酸配列は PLD の推定開始メチオニンから数えて 27 番目のアミノ酸からはじまることから、PLD の前駆体であることが明らかとなった。プロテアーゼザイモグラフィでは、成熟体では活性があるのに対し、プロ体では活性を確認できなかった。以上の結果から本酵素はプレプロ体で発現し、プロ体として分泌された後プロセシングを受け、活性を有する成熟体となることが明らかとなった (Fig. 9)。

第3章 ポリ乳酸分解酵素による分解作用

1. プロテアーゼとしての性質

本酵素はポリ乳酸分解酵素でありながらカゼイン分解活性を有しており (Table 3)、セリンプロテアーゼ活性中心が保存されている (Fig. 8)。ポリ乳酸加水分解にセリンプロテアーゼ活性中心が関与しているかを調べるため、活性中心残基を Ala に置換した H74A、D111A、S195A をそれぞれ作製し活性を測定した。その結果、これらの mutant PLD はプロテアーゼ活性とポリ乳酸分解活性を同時に失っていたことから、ポリ乳酸加水分解活性にはセリンプロテアーゼ活性中心が関与している事が強く示唆された。本酵素の合成基質に対する特異性を調べた結果、トリプシンやキモトリプシン活性測定用の合成基質に対して PLD は分解活性を示さず、エラスターゼ活性測定用の合成基質に対してのみ分解活性が確認された (Table 4)。また PLD はエラスチン分解活性を持っているが、逆にエラスターゼ (Porcine pancreatic elastase I; PPE I) ではポリ乳酸分解活性は認められなかった (Table 4)。PLD の活性は DFP により強く阻害され、10mM の PMSF においても阻害された。しかしながら、エラスターゼに特異的阻害剤であるエラスチナーールでは、PLD は全く阻害されなかった (Table 5)。以上のような基質特異性や阻害剤に対する影響の違いは PLD をトリプシンファミリーに属するプロテアーゼとしてみた場合、以下に述べるようなことが関与していると考えられる。すなわち、P1 サイトに関わると予想されるアミノ酸が典型的なトリプシンファミリーのいずれの酵素とも異なっていること、またトリプシンファミリーでよく保存されているジスルフィド結合 (Cys191、Cys220) が PLD に存在しないことである (Fig. 10)。

2. ポリ乳酸に対する分解作用

次にPLD応用の目的である不溶性高分子ポリ乳酸に対する分解活性について検討した。分子量22万の不溶性ポリ乳酸に対してPLDを作用させると徐々に分解されて可溶性となる。またこの可溶性画分から乳酸が検出された。このことからPLDは不溶性ポリ乳酸に対して作用し、最終的に乳酸にまで分解する活性を有することが判明した。またPLDの各種生分解性プラスチックに対する吸着性を調べたところ、本酵素は、いずれの生分解性プラスチックにも吸着したが、それらの分解はPLAのみでしかおこななかった (Fig. 11A, B)。また、本酵素はPLAフィルムに対しても分解作用を示し、その活性が応用に可塑性が含まれているフィルムや市販ポリ乳酸製品に対しても変わらず、分解産物として乳酸を検出した (Fig. 12A, B)。

第4章 総合論議

本博士論文において、ポリ乳酸分解酵素遺伝子の発現後からポリ乳酸の分解に至るまでの機構を明らかにした。PLDは*Streptomyces lividans*で発現させた場合、プレプロ体で発現し、*S. lividans*のシグナルペプチダーゼによりプロ体として菌体外に分泌され、未知のプロテアーゼもしくは自己分解によって成熟体になると考えられる。さらに分子量20,904の成熟体となったPLDは分子量22万の不溶性ポリ乳酸およびフィルムに吸着し、活性中心残基 His、Asp、Ser が関与する加水分解によって、最終的に乳酸にまで加水分解される。以上のことから、PLDは将来的にポリ乳酸の環境循環リサイクルに応用しうると考えられる。

要旨

本博士論文では以下のことを明らかにした。

1. ポリ乳酸分解酵素 (PLD) 遺伝子のクローニング及び発現、リコンビナントタンパクの精製を行った
2. PLDはprepro体で発現している。発現後Ala26、およびSer35のカルボキシル基側でそれぞれプロセッシングを受け、分子量20,904の成熟体になって初めて活性を有する
3. PLDに保存されているセリンプロテアーゼ活性中心残基His、Asp、Serは、ポリ乳酸分解活性にも関与している
4. PLDは不溶性のポリ乳酸を分解し、その最終生成産物は乳酸である

原著論文

Matsuda E., Abe N., Kaneko J. and Kamio Y. Cloning and expression of the poly(L-lactic acid) depolymerase gene (*pld*) and characterization of the recombinant PLD.

J. Bacteriol. (投稿中)

参考文献

神尾好是、富田敏夫、阿部直樹、松田英美子、中村浩平 (2003). 微生物を用いたポリ乳酸プラスチックの再生利用技術 微生物の取り扱いと利用・応用技術 第7章 第2節 p.142-150. 情報機構

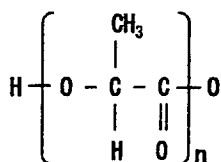


Fig. 1. Chemical structure of Poly(L-lactic acid) ; PLA.

Table 1. Property of biodegradable polymers and petrochemical plastics.

	ガラス 転移点 (°C)	融点 (°C)	引張 強度 (Mpa)	破断 伸び (%)	光線 透過率 (%)	燃焼に 必要な 熱量 (cal/g)
Biodegradable plastics						
PLA	58	175	65	3.0	94	4560
PHB/V	2	154	25	6.5	—	—
PCL	-60	60	15	430	—	—
PBS	-40	110	31	350	—	—
Petrochemical plastics						
PET	—	—	57	300	92	5500
PS	—	—	44	2	90	9600
PE	—	—	16	800	—	11000
PP	—	—	38	700	—	11000

PLA; poly (L-lactic acid), PHB/V; poly (β-hydroxy btyrate/valeryate), PCL; poly caprolactone, PBS; poly (butylene succinate), PET; poly(ethylene terephthalate), PS; polystyrene, PE; polyethylene, PP: polypropylene.

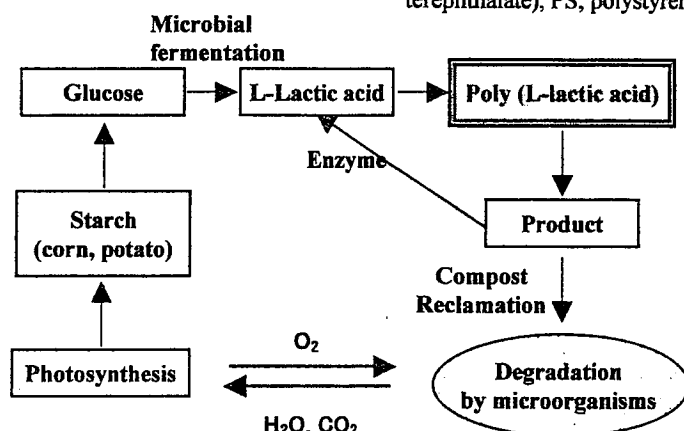


Fig. 2. Poly(L-lactic acid) recycle system.

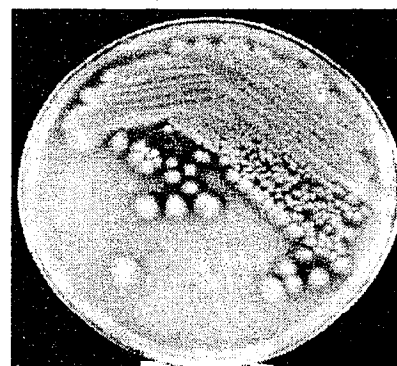


Fig. 3. Poly(L-lactic acid) degradable microorganism *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. K104-1 forms clear zone on the poly(L-lactic acid) - emulsified agar plate.

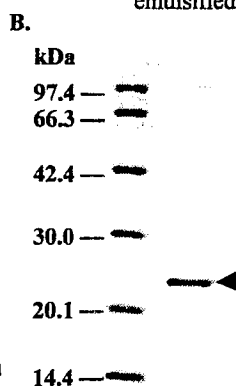
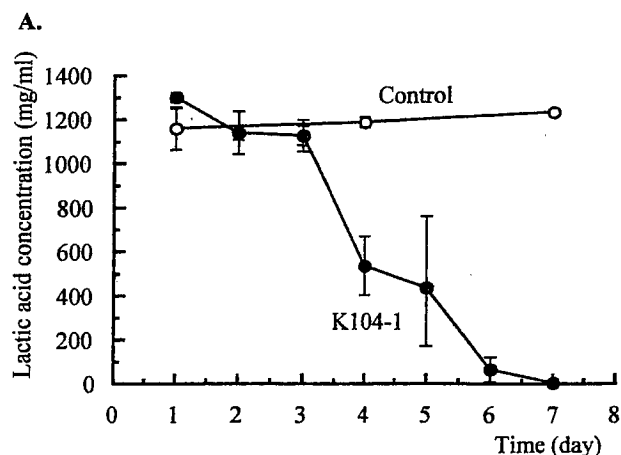


Fig. 4. Degradation and assimilation of the emulsified PLA by *Amycolatopsis* sp. K104-1. A. The strain K104-1 (●) was grown in the PLA-emulsified mineral liquid medium at 37 °C for different times. Residual PLA was hydrolyzed in 1M NaOH at 100 °C for 1h, and the concentrations of lactic acid was quantified. The concentration of PLA was also monitored for the non-inoculated PLA-emulsified medium (○). B. SDS-PAGE for the purified PLA depolymerase.

Table 2. The properties of purified PLA-depolymerase.

Molecular weight	24,000 (SDS-PAGE)
pI	9.3
Optimal pH	9.5
Optimal temperature	55-60 °C
pH stability ^a	<pH 7 (>100%), >pH 8 (68-84%)
Thermal stability ^a	<30 °C(>70%), >60 °C (<20%)

^a Remaining activity is indicated by percentage.

Table 3. Substrate specificity of the purified enzyme.

Substrate	Hydrolysis
PLA	+
Casein (0.1 %, wt/vol)	+
Fibrin (0.3 %, wt/vol)	+
Collagen type 1 (0.1%, wt/vol)	—
Tributyryn (0.1%, wt/vol)	—
Triolein (0.1 %, wt/vol)	—
Poly (β -hydroxybutyrate) (0.1 %, wt/vol)	—
Poly (ε -caprolactone) (0.1 %, wt/vol)	—

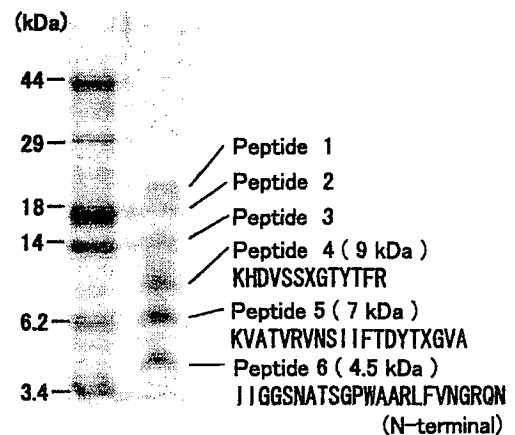


Fig. 5. Lysylendopeptidase digestion of the PLD

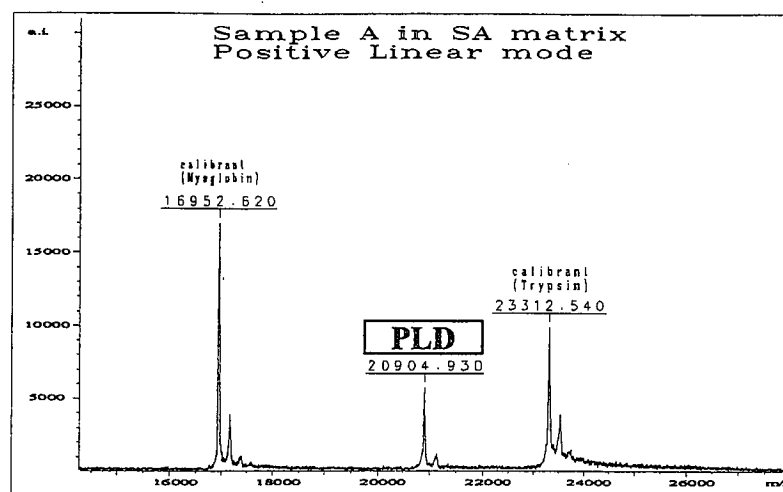
Fig. 6. Nucleotide sequence of poly(L-lactic acid) depolymerase gene (*pld*) and deduced amino acid sequence of PLD. The putative promoter sequences are enclosed in boxes, and proposed ribosome binding site (RBS) is underlined. Palindromic sequences are indicated by convergent arrows. Dot arrows indicate the position of primers for PCR. Italic alphabet shows amino acid sequence which was loose in purified PLD. Underline of amino acid sequence shows confirmed amino acid sequence by protein sequencer.

```

1500 GAAGCCGCGAAGAAGAAGCGGACAGCCCTGAGACATCGAATGCACGGCGCGCGTAGTACGGCTGCAGCGTCCGGTCGCCAGCGCCACAGCCAC
1800 GCCACCGCGCGACGACGAGGACCGCCCGACCGGATCCGCTCGCCACGCCCATCCGACCTCGGGTGTGAGCGTCATGACTCCCGCTCCGGTTCGGT
1700 GCCCGGAACCGTAGGGCGATGCGACGCGGAGTCCTCAAGCCGCGGGTCGATCTCGTCCACCCGAGGTTGAGCCGGAACAGTACGGGAACGACGTC
1800 AGGCCGCTCGCAGCAATAAATACGGATTGACCGCGGACTTTCGTCGGTTCGGGACATTCGCGGCAACTCGGACAATCTCGGGTTCGGTCCCGACCGG
          (-35)                (-10)
1900 CTTTCCCCCGCAGGTTCTCCCCGCGCGAAGGAGTCAGCGTGAAATTGCGCAAGTTCGTCCTGCTGGCGCGAGCACCGCACTGGCGCTGCTCGGCC
          rbs      M K F G K F V L L A A S T A L A V V G L
2000 TCGGCGGTCGGCGCGCGCGACAGCACCCGCGAGGCCGAGCGTCGATCATCGGTGGCAGCAACGCCACGAGTGGCCCTGGGCGGCCGGCTGTTGCTG
          G G P A A A D S T P Q A Q P S I I G G S N A T S G P W A A R L F V
2100 CAAGCGCGCGGAGAAGTGCACCGCGACGATCATCGCCCGCAGTACATCGTCACCGCCAAGCACTGCGTCAGCAGCTCGGCGACCTACAGGTTCCGCATC
          N G R Q N C T A T I I A P Q Y I L T A K H C V S S S G T Y T F R I
2200 GGCAGCCTGGACGAGACGAGCGCGCGCACGATGGCCACCGGCTCCACGATCACGCGCTACCGGGCTCGGCCAGCTGGCGATCGTCCGGCTCACCACCT
          G S L D Q T S G G T M A T G S T I T R Y P G S A D L A I V R L T T S
2300 CGGTGAACGCCACCTACTCGCCACTCGGCAGCGTCGGTGACGTTTCGGTCGGCCAGAACGTCGCTGCTACGGCTGGGCGCGACCGCAGTGCGGCTC
          V N A T Y S P L G S V G D V S V G Q N V S V Y G W G A T S Q C G S
2400 CGAGATCAACTGCCAGTCGCGGTACCTGAAGGTCGCGACGGTGCGGGTGAAGTCACTGATCAGCTGCAGCGACTACACCGCGCGGTCGCGGTGTGCGGGAAC
          E I N C Q S R Y L K V A T V R V N S I S C S D Y T G G V A V C A N
2500 CGCGTCAACGGCATCACCGCGCGCGGACTCCGGCGCGCCGATGTTGCTTCGGCCGCGAGGTCGGCGTCGCGTCGACGAGCGACGGGTGAACAACA
          R V N G I T A G G D S G G P M F A S G R Q V G V A S T S D R V N N T
2600 CGGCGTACACCAACATCAGCGTTATCGCAGCTGGATTCGACGGTGCGGGGCTGTGATTCCGCGGGAACCAACCGGCGCGCAAGGCGGGCCCTT
          A Y T N I T R Y R S W I S Q V A G V *
2700 TCGGGTCAGGACGTCGAAATGTCGTCGAGCTGTCGCGCGCGGGCGCACCGGGTAGAGGTCGCGCGCGGGCTCACCGGTAACCGCGCGCACCGCGT
2800 CCGCGCGCGCGATCACCGCGTCGCGCGCGCGTGACGAGGACGTCAGCGCGCGTACTGCCGGAAGTCCAGCTCCGGGTACGGCCACACCGACGGCCCC

```

Fig. 7. Molecular mass measurement of PLD using MALDI-TOF-MS.



PLD	1:	—VKFGKFLAALSTALAVVGLGGPAAADSTPQAQPSIIGGSNA—TSGPWA—ARLFVNGRQNCATIIAPQYILTAKHC—VSSSGTY
<i>S. coelicor</i> A3 (2)	1:	—MAALLSALSPASAVEPRPGDGGPQPIIGGGYA—QNAQWA—ARLFSGGRQCTSTIIISPTWILTAKHC—VSGGNLA
Rat kallikrein	1:	—MWFLILFLALFLGGIDAAPVQSRIGGFNCEKNSQPMH—VAVYRFARYQCGGVLLDANWVLTAAHC—YNDK—Y
Shrimp Chymotrypsin	1:	—MIGKLSLLVCVAVASGNPAAGKPMHWKSPKPLVDPRILHNLATPRIVGGVEA—TPHSWPHQAALFIDDMYFCGGSLSSEWVLTAAHC—MDGAGFV
Mosquito Trypsin	1:	—MKTIIIVLALCVVSFAFYAEDLWLEKNSMRPLGLED—FEEPTYEGRIVGGNEVPISQFPYQ—LSLRQNGNHICGASIISSNWLSAAHCTFPMPSVAAI
Crab brachyurin	1:	—IVGGVEAVPNSWPHQ—AALFIDDMYFCGGSLSPEWILTAAHC—MDGAGFV
		* ** *
PLD	86:	TFRIGSLDQSGGTMTAGSTITRYPG—SADLAIIVRLTTSVNAT—YSPLG—SV—GDVSVGVNSVYGVGATS—QCG
<i>S. coelicor</i> A3 (2)	79:	FRIGSLDQSGGTVANGVQTVTSP—SADLALVRLDRSVSAT—YARLG—QP—GTVRVGGSVQVYGVGATS—RCG
Rat kallikrein	77:	QVWLKNNRFEDEPSAQHLISKAIPHGFNMSSLNKHOTHPEDDYSNDLMLVRLKKPAEITDVVKPIDLPT—EEPTVGSRLASGWSSTPTTEFE
Shrimp Chymotrypsin	98:	EVVLGAHNIRONEASQVSIITSTDFTHENWNSWLL—TNDIALIRLSPVSLN—SNIKTVKLPSDSVSGTIVTPTGWGRPS—DSA
Mosquito Trypsin	98:	TFRAGSASRLTGGTIFQAAQIIN—HHGYNANNL—DNDVCVIRITTSFTGTN—IAPIT—LV—PSGTAFAAGTRSVVSGWGLTQ—QG
Crab brachyurin	53:	DVVLGAHNIREDEATQVTIQSTDFTHENYNSFVI—SNDIAVVRLPVPVTLTAAIATVGLPST—DVGVGTVVPTGWGLPS—DSA
		* *
PLD	182:	SEINCQSRYLKVATVRVNSI—SCSDYTGGV—AVCANRVNG—ITAGGDSGGPMFASGRVGVAS—TSDRVNNTA—YTNITRYRSWISQVAGV—
<i>S. coelicor</i> A3 (2)	173:	SEINCQSQYLKVANVSVTQG—CYDAYYGQA—ICARPVDG—ITAGGDSGGPMAGGVQVGVAS—TSDRQTITA—YTNVTAYRSWISQVAGV—
Rat kallikrein	202:	YSHDLQCVYLELLSNEVCAK—AHTEKVTDT—MLCAGEMDGGKDCVGDGSGGPLICDGVLQGITSWG—PTPCALPNVPGITYKLEIYRSWIKVDMANNP
Shrimp Chymotrypsin	203:	SGISDVLQVNVPMTNDCDSVYGVIGDG—VVCIDGTGGKSTCNGDSGGPLNLNGMTYGITSFGSSAGCEKGYPAA—FTRVYYYLDWIEQKTGVTP
Mosquito Trypsin	203:	GS—LPTNLRAVDIPVVAQATC—QAQWGSRIILASMVCA—GEPGRDSCNGDSGGPLVTGGRQFGIVSWGAVACGGLAG—VYANVGNAGVRNFISQHTGV
Crab brachyurin	157:	LGISDVLQVDVPI—MNSADCAVYGVITDGN—ICI—DSTGGKTCGDGSGGPLNYDGLTYGITSFGAAAGCEAGYPDAFTRVTYFL—DWIQTGTGITP
	 ***** * * * . . . *

Fig. 8. Amino acid sequence alignment of PLD and related proteins. The asterisks in the bottom of the alignment show same amino acid among six proteins, whereas dots indicate similar amino acid. Triangles are shown active site, which are conserved in chymotrypsin family. Comparison of the amino acid sequence of PLD and other serine protease from prokaryote and eukaryote revealed that PLD exhibits 67 % identity and 74 % positives to putative hydrolase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) (30), 26 % identities and 41 % positives to preproprotein for kallikrein from *Mastomys natalensis* (African soft-furred rat) (31), 29 % identities and 45 % positives to chymotrypsin B1 from *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) (32), 30 % identities and 45 % positives to trypsin-like precursor from *Culex pipiens quinquefasciatus* (southern house mosquito) (33), 29 % identities and 44 % positives to brachyurin from Atrantic san fiddler crab (34), respectively.

Table 5. Effect of various enzyme inhibitors of the purified rPLD.

Inhibitor ^a	Concentration	Residual activity (%)	
		rPLD	PPE I ^b
DFP	1mM	0	0
	10 mM	0	0
PMSF	1mM	93	114
	10 mM	19	90
Elastatinal	0.1 mM	114	0
	1 mM	106	0

^a DFP, diisopropyl fluorophosphate; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride.

^b PPE I is shown in Table 4.

57

PLD 1: ————— I I GGSNATSGPWAARLFVNGR ————— QNCTAT I I APOY I LTAKHCVSSSGTYTFR I GS — LDQTSGGTMA 65
PPEI 1: ————— VVGGEAQRNSWPSQ I SLQYRSGSSWAHTCGGTL I RQNWVMTAAHCVDEL TFRVVVGEHNLNQNDGYEQY 71
RPEI 1: ————— VVGGAEARNSWPSQ I SLQYLSGGSWYHTCGGTL I RRNWVMTAAHCVSSQMTFRVVVGDHNLNQNDGYEQY 71
Bovine Trypsin 1: ————— I VGGYTCGANTVPYQVSL — NSG — YHFCGGSL I NSQWVVAHCHYKSG I QVRLG — ED — N I NVVEGNEQF 66
Bovine Chymo A 1: CGVPA I QPVL SGLSR I VNGEEAVPGSWPQVSLQDKTG — FHFCCGSL I NENWVVAHCHGVTTSDVVVA — GEFDQGSSEK I QK 83

102

PLD 66: TG — ST I TRYPG ————— SADLA I VRLTTSVNA — TYSPLGS — VGDVSV — GQNVSVY — GWGATS — QCGS — E I NCQSRYLKVATVR 140
PPEI 72: VGVQK I VVHPYWNDDVAAGYD I ALLRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAGT I LANNPCY I TGWGLTR — TNGQLAQTQQAYL — PTVD 157
RPEI 72: VSVQK I MVHPTWNSNVAAGYD I ALLRLAQSVTLNLYVQLAVLPQEGT I LANNPCY I TGWGRTR — TNGQLSQTQQAYL — PSVD 157
Bovine Trypsin 67: I SASKS I VHPSYNSNTLNN — D I ML I KLKSAASLNSRVAS I SLPTSCA — SAGTQCL I SGWGNTKSSGT SYPDVLKCLKA — P I LS 148
Bovine Chymo A 84: LK I AKVFKNSKYNSLT I NN — D I TLLKLSTAASFQTVSAVCLPSASDDFAAGTTCVTTGWGLTRYTNANTPDRLQQASL — PLLS 166

189 195

216

226

PLD 141: VNS I SCSDYTGGVA ————— VCAN — RVNG I TA — GDSGGPM — FASGRQV — GVASTSDRV ————— NNTAYTN I TRYRSW I SQ — VAGV 203
PPEI 158: YAI C SSSSYWGSTVKNSMVCAG — GDGVRSGC — GDSSGGLHCLVNGQYAVHGVTSFVSRLG — CNVTRKPTVFTRVSAY I SWNNV I ASN 240
RPEI 158: YSI C SSSSYWGSTVKTTMVCAG — GDGVRSGC — GDSSGGLHCLVNGQYSVHGVTSFVSSMGC — NVSKKPTVFTRVSAY I SWNNV I AYT 240
Bovine Trypsin 149: DSSCKS — AYPGQ I TSNMFCAGYLEGGKDS — GDSSGGLHCLVNGQYSVHGVTSFVSSMGC — NVSKKPTVFTRVSAY I SWNNV I AYT 223
Bovine Chymo A 167: NTNCKK — YWGTK I KDAM I CAG — ASGVSSC — GDSSGGLVCKKNGAWTLVG I VSWGS — STC — STSTPGVYARVTALVNWVQQTAAAN 245

Fig. 10. Alignment of amino acid of PLD and serine proteases. PPE I ; Pancreatic elastase I , RPE I ; Rat pancreatic elastase I and Bovine Chymo; bovine chymotrypsin A. Number on alignment are shown as chymotrypsin number.

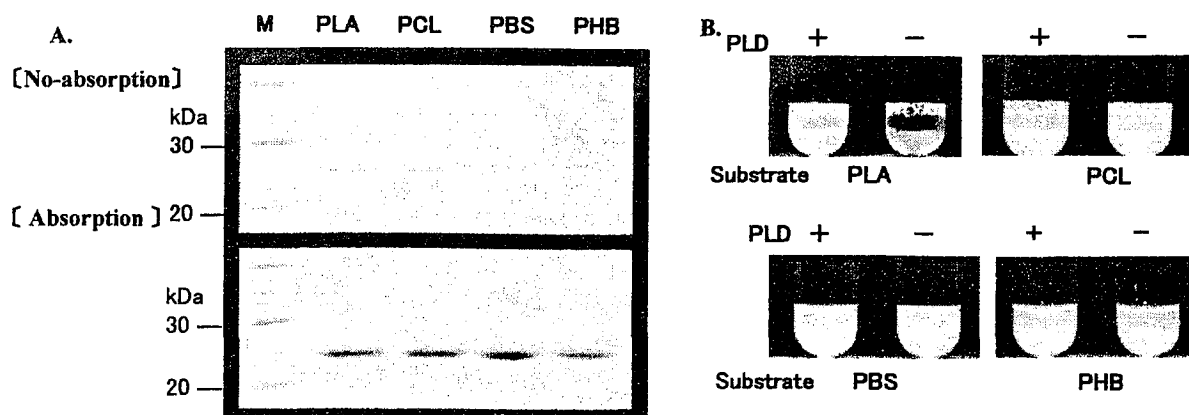


Fig. 11. Absorption assays and substrate specificity. A. Absorption assay using SDS-PAGE. B. Substrate specificity.

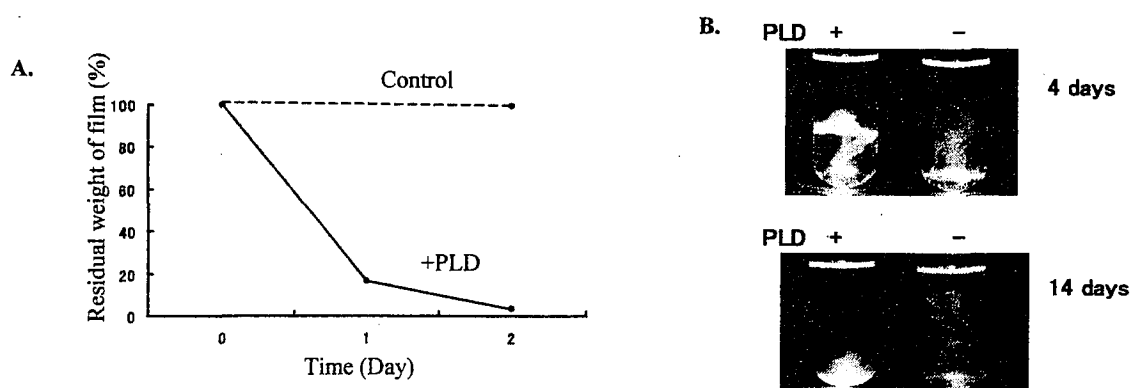


Fig. 12. PLA products degradation assay with PLA Film (A) and PLA product (B). A. 10 mg of PLA film were added. Residual weight of film were shown as percentage. B. PLD has an ability of degradation of 15 mg of PLA products completely.

論文審査結果要旨

微生物により分解可能である生分解性プラスチックは、これまでに様々なものが作られているが、その中でもポリ乳酸は優れた物性等の理由により、将来の大量生産および大量消費が予想されている。しかしその土壌中での分解には年単位の時間が必要であり、問題となっている。このような背景から本研究室ではポリ乳酸分解菌の分子生物学的育種を目的として、ポリ乳酸分解菌 *Amycolatopsis* sp.K104-1 株をスクリーニングし、世界で初めてポリ乳酸分解酵素 (PLD) の精製に成功し、酵素の諸性質について報告している。

本博士論文は更なる PLD の解析と応用研究を進めることを目的として、PLD 遺伝子の解析、組換え PLD (rPLD) の発現および成熟型 PLD の生成機構、さらに PLD によるポリ乳酸の分解機構について研究を行っている。

最初に PLD 遺伝子のクローニングを行い、塩基配列およびアミノ酸配列を行っている。決定した配列から予想される分子量は、MALDI-TOF-MS を用いた実測値と完全に一致しており、決定した塩基配列およびアミノ酸配列の正確さを証明した。精製酵素は 609bp, 203 アミノ酸残基からなる分子量 20,904 のタンパク質であることを決定した。

次に、クローン化した遺伝子が確かに PLD 遺伝子であるということの証明と、高発現系の構築を目的として PLD の *Streptomyces lividans* を用いた発現系の構築を行っている。得られた rPLD は *Amycolatopsis* sp.K104-1 株からの精製よりも収量が 18 倍に増加し、その比活性や諸性質も一致していた。このことから、*S.lividans* を宿主とした場合でも正確なタンパク質の折りたたみが行われていることを示した。また rPLD の精製過程において PLD 前駆体を見出し、成熟型 PLD の生成機構を解明し、さらに rPLD は成熟型になって初めて活性を持つ事を、プロテアーゼザイモグラフィを用いた解析により証明している。

また PLD はプロテアーゼ活性を有していることから、rPLD のプロテアーゼとしての性質を解析している。合成基質を用いた解析、X 線結晶構造解析が終了している既知のプロテアーゼとのアミノ酸レベルでのホモロジー検索、および阻害剤に対する影響などから、PLD はエラスターゼ様の基質特異性をもっているが、活性中心に関わるアミノ酸の違いなどから、新規のプロテアーゼであることを示唆している。また PLD に保存されているプロテアーゼ活性中心残基がポリ乳酸分解活性にも関与している事を、部位特異的変異タンパク質を作製して証明した。

最後に PLD の本来の基質であるポリ乳酸の分解機構について解析を行っている。PLD の水溶性の分解産物には乳酸だけでなく乳酸 2 量体が存在することを ¹H-NMR の構造決定により証明した。したがって、PLD はポリ乳酸をエンド型酵素として作用し、高分子ポリ乳酸を最終的に乳酸にまで分解する事を示した。ポリ乳酸分解酵素の分解機構について明らかにした知見は、これが初めてである。

以上のように本研究は PLD の遺伝子発現から、成熟型 PLD の生成およびポリ乳酸の分解に至る一連の機構を解明したものであり、審査員一同は本研究者に博士 (農学) の学位を授与するのに値するものと認定した。